



TITLE:

Characterization of the antibodies and antibody technologies to improve the pharmaceutical activity(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Shinmi, Daisuke

CITATION:

Shinmi, Daisuke. Characterization of the antibodies and antibody technologies to improve the pharmaceutical activity. 京都大学, 2018, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2018-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13145>

RIGHT:

Reprinted with permission from Bioconjugate Chem., 2016, 27, 1324-1331. Copyright (2016) American Chemical Society.
10.1021/acs.bioconjchem.6b00133, 10.1002/cam4.1003,
10.1038/srep17936.

京都大学	博士（工学）	氏名	新見 大輔
論文題目	Characterization of the antibodies and antibody technologies to improve the pharmaceutical activity (薬学的活性を改善するための抗体および抗体技術に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>抗体医薬品は、生体を持つ免疫システムの 1 つである抗体を利用した医薬品であり、様々な疾患を治療する優れた手段として用いられている。ハイブリドーマ法を用いたモノクローナル抗体の作製技術や、抗原性の課題を克服するために動物由来の抗体を部分的にヒト抗体配列に置き換えるキメラ抗体技術やヒト化抗体技術の確立により、現在では 40 以上の抗体医薬品ががんや免疫疾患などの治療のための医薬品として上市されている。しかし、このように臨床的に効果が認められた抗体医薬品が生み出されている一方で、それ以上に多くの抗体医薬品候補が、その有効性が認められないとして臨床試験に失敗している。申請者はこのような抗体医薬の弱点の克服を目指し、抗体医薬品の有効性の向上に関する研究を遂行した。そして、その成果を序論、本論 3 章、結論から構成される本論文に纏めている。第 1 章では、抗体に細胞障害活性の高い低分子化合物を化学的に結合させることにより、標的細胞に高い薬理活性を付与した抗体薬物複合体 (Antibody-drug conjugate: ADC) について、低分子化合物を抗体の部位特異的に結合させる技術に注目し、簡便に ADC を作製できる改変抗体技術を確立した。第 2 章においては、生体内で細胞膜型および可溶型が存在する抗原に関し、細胞膜型には強く結合する一方で、可溶型に対する結合活性が弱い抗体を作製した。また本抗体を用いた ADC が、可溶型抗原に影響されることなく細胞膜型抗原に結合して細胞障害活性を発揮することを示した。第 3 章では、細胞膜上の抗原に結合し、架橋剤なしに細胞内にアポトーシスシグナルを伝達させる抗体に関して、抗体および抗原抗体複合体の三次元立体構造を X 線結晶構造解析で決定し、その活性化メカニズムを明らかにした。以下にその概要を示す。</p> <p>序論 抗体の概要、抗体医薬品の研究開発の現状、及び本研究の意義などがまとめられている。</p> <p>第 1 章 現在開発中のほとんどの ADC は、抗体のアミノ基もしくはシステイン (Cys) ジスルフィド結合を還元して得られたチオール基を利用して薬剤を結合させたものであるため、結合部位や結合数が不均一な形状となっている。このような不均一性は薬物動態、薬効および安全域に強く影響することから、現在では均一な ADC を作製する技術、すなわち抗体の部位特異的に薬剤を結合する技術 (部位特異的修飾技術) の開発が盛んに実施されている。Cys 導入抗体は、培養時の添加剤や細胞エンジニアリングが不要であり、ADC 作製で利便性の高い部位特異的修飾技術である。しかしながら、一般的な Cys 導入抗体は、動物細胞を用いた発現の際、導入した Cys 残基が酸化されるため、ADC 作製の前には還元工程などの複雑な前処理が必須となる。我々は、これまでに抗体 Fab フラグメントを活用した探索研究にて、部位特異的 ADC に活用できる独自の Cys 残基を見出したことを報告してきた (Bioconjugate Chem. 2015, 26, 1032-1040)。本章では、最も反応性が高い抗体軽鎖の Q124C という変異部位に関して、IgG での検証を行った。その結果、これまでは導入 Cys 残基が酸化されるという常識を覆し、高い反応性を保持する結果、培養後の IgG 変異体を直接 ADC 化できるこ</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	新見 大輔
<p>とを明らかにした。既報から、ADC の化学修飾に関して、Cys-マレイミド修飾は部位に応じて血漿中安定性が低下するものの、アルカリ条件下にてマレイミド開環を行うことが解決策の 1 つとして提案されている。Q124C についても安定性の課題が見えたが、陰イオン交換樹脂上で簡便に開環できる方法を構築し、その結果、安定性も改善できることを明らかにした。以上の知見は、Q124C 変異体 (<u>active thiol antibody: Actibody</u>) が、簡便に安定な部位特異的 ADC を提供できる技術になることを示すものである。</p> <p>第 2 章 癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen: CEA, CEACAM5, CD66e) は、癌特異的抗原として古くから知られている代表的な腫瘍マーカーであり、様々な癌細胞に特異的に高発現する膜タンパク質である。CEA は、その発現特異性から、長く癌治療抗体医薬品の標的として研究されてきた。しかしながら、これまでに幾つかの臨床試験が実施されたものの、上市された製品は存在しない。ところで、CEA は膜タンパク質として発現されるものの、酵素による切断によって一部は可溶型 CEA として血中に分泌することが知られている。本章では、可溶型 CEA と血液循環中の抗 CEA 抗体とが結合することによる腫瘍細胞への集積阻害が抗 CEA 抗体の薬効を減弱させている要因と考え、膜型 CEA に強く結合し、可溶型 CEA への結合活性が低いという特性を持つ新規抗 CEA 抗体 15-1-32 を見出した。この 15-1-32 で作製した ADC は、CEA 発現癌細胞に対して高い細胞傷害活性を発揮した上に、既存抗体で作製した ADC とは異なり、その細胞傷害活性は可溶型 CEA に阻害されなかった。これらの結果は、自社抗 CEA 抗体 15-1-32 が、既存抗体とは異なり、血中の可溶型 CEA に阻害されることなく CEA 高発現の癌に対して高い抗腫瘍効果をもたらす抗体医薬品になる可能性を示すものである。</p> <p>第 3 章 完全ヒトモノクローナル抗体 KMTR2 は、腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド受容体 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2: TRAIL-R2) に対して、ほとんどの既存抗体とは異なり、架橋剤無しでアポトーシスシグナルを誘導する強い単体アゴニスト活性を示す特性の抗体である。本章では、KMTR2 による単体アゴニスト活性発現メカニズムを明らかにすることを目的に、TRAIL-R2 の細胞外領域と KMTR2 の Fab フラグメント (KMTR2-Fab) の複合体結晶構造を 2.1 Å 分解能で決定した。KMTR2-Fab2 分子は結晶学的 2 回対称に基づき軽鎖の CDR2 領域間で会合しており、この会合が TRAIL-R2 重合を促進していると考えられた。そこで、軽鎖 CDR2 間に存在する 53 番目のアスパラギン (Asn) をアルギニン (Arg) に置換した変異体を作製し、種々の機能を解析した結果、Arg 変異体は抗原結合活性を保持したまま、アポトーシス誘導活性を失うことが判明した。これらの結果から、結晶中に観察された結晶学的 2 回対称に基づく KMTR2 の二量体化が核となることで TRAIL-R2 の超重合状態が惹起され、腫瘍細胞の細胞死を誘導するアゴニスト活性を発現していることを明らかにした。</p> <p>結論 本論文で得られた成果について要約している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、抗体医薬品の有効性の向上を目指し、抗体薬剤複合体（ADC）作製のための改変抗体技術の検証、および特徴ある新規抗体の作製、解析を遂行した成果についてまとめたものであり、得られた成果は次のとおりである。

1. 薬剤結合数の均一な ADC を作製する技術は、薬物動態、薬効および安全域の確保の観点から重要である。システイン（Cys）導入抗体は、ADC 作製において利便性の高い部位特異的修飾技術であるが、酸化された Cys 残基を還元する工程などの複雑な前処理が必須となる。ヒト IgG 抗体軽鎖において、溶媒露出度が低く、極めて奥まった部位に存在する 124 番目のグルタミンを Cys に置換した Cys 導入抗体は、高いチオール反応性を保持し、前処理なしに 1 工程で ADC 化できることを明らかにしている。また、ADC の化学修飾における Cys-マレイミド修飾の部位に応じた血漿中安定性の低下について、陰イオン交換樹脂上で簡便に開環できる方法を構築し、安定性も改善できることを明らかにしている。これらの結果は、本 Cys 導入抗体により、簡便かつ安定な部位特異的 ADC を提供できることを示すものである。
2. 抗癌胎児性抗原（CEA）抗体である 15-1-32 は、膜型および可溶型が存在する CEA に対し、膜型 CEA に強く結合し、可溶型 CEA への結合活性が低いという特性を持つことを明らかにしている。また、本抗体で作製した ADC は、CEA 発現癌細胞に対して高い細胞傷害活性を発揮した上に、その細胞傷害活性は可溶型 CEA に影響されないことを明らかにしている。これらの結果は、15-1-32 が、血中の可溶型 CEA に阻害されることなく、高い腫瘍蓄積性とそれに伴う抗腫瘍効果をもたらす抗体医薬品になる可能性を示すものである。
3. 腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド受容体（TRAIL-R2）に対し、単体アゴニスト活性を示す抗体 KMTR2 は、これまでその活性発現メカニズムが未知であった。TRAIL-R2 の細胞外領域と KMTR2 の Fab フラグメント（KMTR2-Fab）の複合体結晶構造の解析から、KMTR2-Fab2 分子は結晶学的 2 回対称に基づき軽鎖の CDR2 領域間で会合することを明らかにしている。また、この会合には軽鎖 CDR2 内に存在する 53 番目のアスパラギン（Asn）が重要であり、その Asn 残基をアルギニンに置換した変異体（LkN53R）が KMTR2 の会合を阻み、単体アゴニスト活性を消失させることを明らかにしている。これらの結果は、KMTR2 は、軽鎖 CDR2 を介した二量体化が核となり TRAIL-R2 の超分子集合が惹起され、単体アゴニスト活性が発現することを示唆するものである。

本論文は、有効性の高い抗体医薬品の創製にあたり、新たな知見を加えるものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 29 年 12 月 29 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。